

Zur Biosynthese des Adrenalins
Reinigung und Spezifität der 3.4-Dihydroxy-
phenylalanin-Decarboxylase

Inaugural-Dissertation

zur

Erlangung der Doktorwürde
der Hohen Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von

Dorothea Aures
aus Kaiserslautern

Juni 1959



5349/60

Berichterstatter: 1. Prof. Dr. Dr. E. Werle

2. Prof. Dr. F. Lynen

Tag der mündlichen Prüfung:

18.11.59

Die wesentlichen Teile der Dissertation von Fräulein Dorothea Aures sind in Hoppe-Seylers Zeitschrift für Physiologische Chemie unter dem Titel: „Über die Reinigung und Spezifität der DOPA-Decarboxylase“ veröffentlicht worden.

Mit Genehmigung der Naturwissenschaftlichen Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität zu München wurden die Sonderdrucke der Veröffentlichung an Stelle der gedruckten Pflichtexemplare eingereicht.



Über die Reinigung und Spezifität der DOPA-Decarboxylase

Von

E. Werle und D. Aures*Aus dem Laboratorium der Chirurgischen Klinik der Universität München,
Direktor Prof. Dr. R. Zenker

(Der Schriftleitung zugegangen am 23. April 1959)

Herrn Professor Dr. Dr. h. c. St. Goldschmidt zum 70. Geburtstag

Organextrakte, die in vitro eine Decarboxylierung von 3,4-Dihydroxy-phenylalanin (DOPA**) bewirken, katalysieren auch die Spaltung von 3,4-Dihydroxy-phenylserin (DHPS)^{1,2}. Das Verhältnis der Aktivität von Organextrakten gegenüber DOPA und DHPS unterliegt bei den gleichen Organen verschiedener Arten großen Schwankungen. Durch Pyridoxalphosphat wird die Aktivität der Extrakte gegenüber DOPA wesentlich stärker erhöht als gegenüber DHPS. Diese Unterschiede könnten darauf beruhen, daß die Aktivität ein und desselben Fermentes durch Begleitstoffe gegenüber den beiden Substraten in wechselnder Weise beeinflußt wird, oder darauf, daß die Substanzen durch zwei verschiedene Fermente decarboxyliert werden. Da kein Organ auffindbar war, das nur eines der beiden Substrate decarboxyliert, suchten wir die aufgeworfene Frage durch Anreicherung der DOPA-Decarboxylase zu entscheiden.

Da nach Werle und Sell² die enzymatische Decarboxylierbarkeit der Phenylserinderivate in Bezug auf OH-Substitution am Ring den gleichen Gesetzmäßigkeiten unterliegt wie die Decarboxylierbarkeit der Phenylalaninderivate³, wurde auch 3-Hydroxy-phenylserin als Substrat verwendet.

Nach Clark, Weissbach und Udenfriend⁴ ist die 5-Hydroxy-tryptophan-Decarboxylase der Meerschweincheniere von der DOPA-

* Die Ergebnisse dieser Arbeit sind der Dissertation von Fräulein Dorothea Aures an der Naturwissenschaftlichen Fakultät der Universität München entnommen.

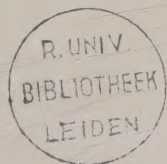
** Es werden folgende Abkürzungen verwendet: DOPA = 3,4-Dihydroxy-phenylalanin, DHPS = 3,4-Dihydroxy-phenylserin, 3-HPS = 3-Hydroxy-phenylserin, 5-HT = 5-Hydroxy-tryptophan, DOPAAmin = β -[3,4-Dihydroxy-phenyl]-äthylamin.

¹ K. H. Beyer, H. Blaschko, J. H. Burn u. H. Langemann, *Nature* [London] **165**, 926 [1950]; H. Blaschko, J. H. Burn u. H. Langemann, *Brit. J. Pharmacol. Chemotherapy* **5**, 431 [1950]; Th. Sourkes, P. Heneage u. Y. Trano, *Arch. Biochem. Biophysics* **40**, 185 [1952]; E. Werle u. J. Jüntgen-Sell, *Biochem. Z.* **327**, 259 [1955].

² E. Werle u. J. Sell, *Biochem. Z.* **326**, 110 [1954].

³ H. Blaschko, *Biochim. biophysica Acta* [Amsterdam] **4**, 130 [1950].

⁴ C. T. Clark, H. Weißbach u. S. Udenfriend, *J. biol. Chemistry* **210**, 139 [1954].



Decarboxylase verschieden. Es wurde daher von uns untersucht, ob bei der Anreicherung der DOPA-Decarboxylase die 5-HT-Decarboxylase abgetrennt wird. In diesem Zusammenhang wurde auch das Verhalten der Histidin-Decarboxylase geprüft.

Beschreibung der Versuche

1. Bestimmung der Decarboxylaseaktivität

Die Aktivität der Organextrakte wurde manometrisch in der Warburg-Apparatur bestimmt. Es wurden Reaktionsgefäße mit zwei Ansatzbirnen verwendet, die eine für Substrat (im Kontrollansatz für Wasser), die andere für Schwefelsäure zum Abstoppen der Reaktion. Im Hauptraum befand sich jeweils die gepufferte Enzymlösung. Inkubation bei 38,5° in Stickstoffatmosphäre.

Als Einheit der Aktivität dient: $Q_{CO_2} = \mu l \text{ CO}_2/\text{mg Protein N}/10 \text{ Min.}$ bei folgenden Versuchsbedingungen:

Ansatz: In den Hauptraum gibt man Enzymlösung (sie soll bei DOPA in 10 Min. 30–60 μl , bei DHPS in 30 Min. 25–30 $\mu l \text{ CO}_2$ entwickeln), 1,5 ml 0,1*m* Phosphatpuffer, p_H 6,8 (DOPA) bzw. 7,6 (DHPS, 3-HPS und 5-HT), 200 γ Pyridoxalphosphat* und Wasser ad 4,5 ml. Der Kipper enthält 5 μMol L-3,4-Dihydroxy-phenylalanin* (DOPA) (0,985 mg) bzw. 10 μMol DL-erythro-3,4-Dihydroxy-phenylserin** (DHPS) (2,13 mg) bzw. 10 μMol DL-erythro-3-Hydroxy-phenylserin** (3-HPS) (1,97 mg) bzw. 10 μMol DL-5-Hydroxy-tryptophan* (5-HT) (2,23 mg), gelöst in 0,4 ml Wasser. Die Substratendkonzentration beträgt dann $10^{-3}m$ (DOPA) bzw. $2 \times 10^{-3}m$ (DHPS, 3-HPS, 5-HT). Reaktionszeit für DOPA als Substrat: 10 Min., für alle anderen Substrate 30 Min. Die für DHPS, 3-HPS und 5-HT erhaltenen CO_2 -Werte werden auf 10 Min. Reaktionszeit umgerechnet.

Der Stickstoff- und Proteingehalt der Fermentlösungen wurde spektrophotometrisch nach der Biuret-Methode⁵ unter Verwendung eines für den betreffenden Organextrakt durch Kjeldahl-Bestimmung ermittelten Faktors bestimmt. Bei höher gereinigten Extrakten wurde die spektrophotometrische Methode nach Warburg und Christian⁶ mit den von Pogell und Gilvery⁷ angegebenen Umrechnungsfaktoren verwendet.

Die angegebenen Aktivitäten sind Mittelwerte aus mindestens je zwei Hauptversuchen (Enzym mit Substrat) abzüglich der Leerwerte (Enzym ohne Substrat). Die Werte von Parallelversuchen unterschieden sich höchstens um $\pm 5\%$.

2. Anreicherung von DOPA-Decarboxylase

Gewinnung des Rohextraktes: Frische oder eingefrorene Meerschweinchenieren werden im Fleischwolf zerkleinert (Homogenate sind für den im folgenden beschriebenen Reinigungsweg weniger geeignet), in je 2 ml eiskaltem Wasser und 2 ml Universalpuffer nach Teorell und Stenhagen⁸, p_H 5,5, pro g Niere suspendiert und 2–12 Std. bei 0° extrahiert. Der Extrakt wird durch ein dichtgewebtes Nylontuch filtriert.

Hitzeschritt: Der Rohextrakt wird vorsichtig mit 1*n* HCl auf p_H 5,7 gebracht, im Wasserbad rasch auf 50–51° erhitzt und nach 5 Min. im Eis-Kochsalz-Bad auf 0° abgekühlt. Zur Ermittlung des Q_{CO_2} -Wertes wird in einer aliquoten Probe das ausgefallene Protein abzentrifugiert.

⁵ A. G. Cornall, C. J. Bardwill u. M. M. David, J. biol. Chemistry **177**, 751 [1949]; G. R. Kingsley, J. biol. Chemistry **131**, 197 [1939]; derselbe, J. Lab. clin. Med. **27**, 840 [1942].

⁶ O. Warburg u. W. Christian, Biochem. Z. **310**, 384 [1941].

⁷ B. M. Pogell u. R. W. McGilvery, J. biol. Chemistry **208**, 149 [1954].

⁸ T. Teorell u. E. Stenhagen, Biochem. Z. **299**, 417 [1938]; vgl. auch l.c.¹⁰

* Fa. Hoffmann-La Roche.

** Die Phenylserine verdanken wir der Freundlichkeit von Herrn Prof. Dr. G. Ehrhardt, Farbwerke Hoechst, Frankfurt a. M.

Kieselguradsorption: Zur eisgekühlten Enzymlösung wird bidest. Glycerin gegeben (Endkonzentration $1m$). Dazu werden pro 100 ml Lösung 15 g Kieselgur (Fa. Merck, mit HCl gewaschen und gegläht) in 30 ml $1m$ Glycerinlösung eingerührt. Nach $\frac{1}{2}$ stdg. Rühren bei 0° wird 15 Min. bei $8000 \times g$ abzentrifugiert.

Ammoniumsulfatfällung: Der klare, gelbrot bis kräftig rot gefärbte Überstand wird mit Äthylendiamin-tetraacetat (Trilon B, Fa. Merck, Endkonzentration $10^{-3}m$) versetzt und mit einigen Tropfen $0,5n\text{ HCl}$ auf $p_H 5,6$ eingestellt. Bei guter Eiskühlung und unter ständigem Rühren wird innerhalb von 2 Std. Ammoniumsulfat bis zur 55proz. Sättigung zugegeben. Es wird dann noch 30 Min. lang weiter gerührt und schließlich 15 Min. bei $8000 \times g$ abzentrifugiert. Der Überstand wird verworfen. Der Niederschlag wird in $\frac{1}{10}$ des zur Ammoniumsulfatfällung eingesetzten Volumens einer $0,35$ gesätt., eisgekühlten, mit Teorell-Stenhagen-Puffer auf $p_H 4,9$ eingestellten Ammoniumsulfatlösung suspendiert. Nach 10 Min. wird bei 0° abzentrifugiert. Der Überstand enthält etwa 50% des Proteins und höchstens 10% der Fermentaktivität (Frakt. a). Der Rückstand wird unter Eiskühlung in einer $0,26$ gesätt., mit Teorell-Stenhagen-Puffer auf $p_H 5,6$ eingestellten Ammoniumsulfatlösung ($\frac{1}{10}$ Volumen der zur Ammoniumsulfatfällung eingesetzten Enzymlösung), suspendiert. Vom Ungelösten wird abzentrifugiert. Der Überstand enthält das Ferment (Frakt. b). Der Rückstand wird in wenig Wasser suspendiert (Frakt. c).

Die Fraktionen a, b und c werden bei 0° gegen das 20 fache Vol. einer $10^{-3}m$ Trilon-B-Lösung, die mehrmals gewechselt wird, anschließend gegen bidest. Wasser dialysiert. Zur Abtrennung des Coenzym wird Frakt. b 2 Tage gegen $0,2\text{proz.}$ $\text{Na}_2\text{-Trilonat} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ($5,4 \times 10^{-3}m$) und anschließend gegen mehrmals gewechseltes bidest. Wasser dialysiert.

Weitere Reinigung an anionotropem Aluminiumoxyd: $1\text{ kg Al}_2\text{O}_3$ (Brockmann) wurde mit 2 l siedender $1n\text{ HCl}$ übergossen, $2\frac{1}{2}\text{ Std.}$ im kochenden Wasserbad erhitzt und 10mal mit 5 l bidest. Wasser gewaschen. p_H der Waschflüssigkeit nach dem letzten Auswaschen $3,8$. Das Aluminiumoxyd wurde dann abgesaugt und bei 37° getrocknet.

In ein Chromatographierohr von 25 mm lichter Weite wurden 200 g so bereitetes Aluminiumoxyd mit Wasser gespült. Höhe der Füllung: $42,5\text{ cm}$. Es wurde so lange Wasser durchgeschickt, bis die Waschflüssigkeit frei von Al_2O_3 -Partikelchen war ($p_H 4,1$). Die Säule wurde bei 2° mit Enzymlösung (20 ml Frakt. b, $Q_{\text{CO}_2, \text{DOPA}} = 1250$; $0,4\text{ mg N/ml}$; Phosphatkonzentration $0,10m$, $p_H 6,2$) beschickt und dann mit $0,10m$ Phosphatpuffer, $p_H 6,2$, eluiert. Vor dem Auftreten von Phosphat im Eluat wurden 50 ml (Frakt. 1—12), dann Fraktionen von je 30 ml gesammelt.

Ergebnisse

1. Reinigung des Enzyms und Abtrennung des Coenzym

Bei 12 über Hitzeschritt, Kieselguradsorption und Ammoniumsulfatfraktionierung hergestellten Präparationen lagen die $Q_{\text{CO}_2, \text{DOPA}}$ -Werte der Fraktion b je nach Güte des Ausgangsmaterials zwischen 450 und 1500 , entsprechend 18 — 32 facher Anreicherung bei Ausbeuten von 60 — 90% . Ein Beispiel zeigt Tab. 1.

Ein Beispiel zur weiteren Reinigung der DOPA-Decarboxylase durch Chromatographie an anionotropem Aluminiumoxyd ist in Abb. 1 dargestellt. Die aktivste Fraktion (Nr. 16) hat einen $Q_{\text{CO}_2, \text{DOPA}}$ -Wert von 4250 , was in diesem Falle einer Anreicherung auf das 82 fache entspricht.

Tab. 1. Beispiel zur Anreicherung der DOPA-Decarboxylase aus Meerschweinchen-nierenextrakt und Aktivität gegenüber DHPS und 5-HT. Aktivitätsbestimmung unter Standardbedingungen.

Reinigungsschritt	$Q_{CO_2, DOPA}$	$Q_{CO_2, DHPS}$	$\frac{Q_{CO_2, DOPA}}{Q_{CO_2, DHPS}}$	Ausbeute in % der einge- setzten Ferment- menge	Anrei- cherung
1. Rohextrakt	48	1,7	28,2	—	1
2. Hitzeschritt	146	—	—	80	3,0
3. Kieselguradsorption	229	—	—	86	4,8
4. $(NH_4)_2SO_4$ -Fällung					
a) 35—55%	35	—	—	—	—
b) 26—35%	1400	44	31,8	85	29,2
c) 0—26%	11	—	—	—	—
	$Q_{CO_2, DOPA}$	$Q_{CO_2, 5-HT}$	$\frac{Q_{CO_2, DOPA}}{Q_{CO_2, 5-HT}}$		
Rohextrakt	36	5,8	6,2	—	1
$(NH_4)_2SO_4$ -Fällung					
b) 26—35%	715	110	6,5	—	19,9

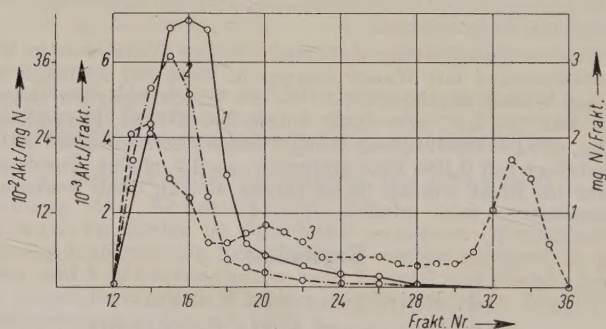


Abb. 1. Chromatographie der DOPA-Decarboxylase an Aluminiumoxyd.

Kurve 1 gibt die $Q_{CO_2, DOPA}$ -Werte, Kurve 2 die DOPA-Decarboxylaseaktivität pro Fraktion und Kurve 3 den Stickstoffgehalt pro Fraktion an.

Aus Tab. 2 geht hervor, daß sich das Coenzym durch Dialyse gegen Trilon-B-Lösung vom Fermentprotein abtrennen läßt. Dieses wird dabei nicht nennenswert denaturiert; es ist durch Pyridoxalphosphat zu 87% reaktivierbar. Dialyse gegen 10^{-3} m Ammoniak führt zwar ebenfalls zu einer Abspaltung des Cofermentes, doch wird gleichzeitig das Apoenzym weitgehend denaturiert.

Tab. 2. Aktivierbarkeit der DOPA-Decarboxylase-Lösungen verschiedener Reinheitsgrade und der Apodecarboxylase durch Pyridoxalphosphat. — Reaktionsbedingungen wie bei der Q_{CO_2} -Bestimmung; die Fermentmenge wurde jeweils so dosiert, daß 30–40 μ l CO_2 /10 Min. entwickelt wurden.

Fermentlösung	μ l CO_2 /10 Min./mg N		100 $\times$ a/b (%)
	a ohne Pyridoxalph.	b mit Pyridoxalph.	
Rohextrakt	28	50	56
Hitzeschritt	107	182	59
Kieselguradsorption	115	268	43
Lösung b nach Dialyse gegen Wasser	377	1300	29
Lösung b nach Dialyse gegen $5,4 \times 10^{-3}m$ Trilon-B-Lösung . .	51	1125	4,5

2. Eigenschaften der angereicherten DOPA-Decarboxylase

a) Stabilität: Die auf das 18–32fach angereicherten Fermentpräparate (Frakt. b der Ammoniumsulfat-Fraktionierung) sind verhältnismäßig stabil: Bei -15° aufbewahrt, waren sie 4 Monate lang unverändert haltbar. Nach 12 Monaten war eine Aktivitätsabnahme von 20% eingetreten. Das Ferment ist gegen öfteres Auftauen empfindlich. Es kann durch Versetzen mit Glycerin (Endkonz. 1m) stabilisiert werden.

Das an Aluminiumoxyd gereinigte Ferment ist sehr instabil. Es verliert bei 0° innerhalb von 2 Tagen seine Aktivität fast vollkommen. Wie aus dem Vergleich der UV-Absorptionsspektren von aktiven Fermentpräparaten vor und nach der Chromatographie hervorgeht, werden bei der Behandlung mit Aluminiumoxyd Nucleinsäuren abgetrennt, die zwar für die Aktivität der DOPA-Decarboxylase nicht notwendig sind, wahrscheinlich aber das Ferment stabilisieren.

b) Substratspezifität: Die Geschwindigkeit der CO_2 -Entwicklung ist bei DOPA als Substrat immer etwa 30 mal so hoch wie die bei DHPS. Unter den angegebenen Standardbedingungen ändert sich bei 30facher Anreicherung dieses Verhältnis gegenüber dem Ausgangswert nicht signifikant (s. Tab. 1).

Das Verhältnis $Q_{CO_2, DOPA}/Q_{CO_2, DHPS}$ wurde auch an den unbeständigen Fraktionen des Säulenchromatogramms geprüft; obwohl zur Zeit der Messungen ihre Aktivität schon stark abgenommen hatte, war das Verhältnis unverändert.

Histidin-Decarboxylase wird bei der Reinigung von der DOPA-Decarboxylase abgetrennt (Decarboxylierungsansätze und Bestimmung des gebildeten Histamins am isolierten Meerschweinchenileum nach l. c.⁹; schon beim Erhitzen des Meerschweinchenieren-Extraktes auf 50° (Hitzeschritt der DOPA-Decarboxylase-Reinigung) wird die Histidin-

⁹ E. Werle, A. Schauer u. G. Hartung, Klin. Wschr. **33**, 562 [1955].

Decarboxylase zerstört. Das Verhältnis der Aktivität gegenüber 5-HT und DOPA ändert sich im Verlauf der DOPA-Decarboxylaseanreicherung nicht (Tab. 1).

Die Decarboxylierungsaktivität des Rohextraktes ist, wenn DOPA gleichzeitig mit DHPS oder 5-HT angeboten wird, in keinem Fall gleich der Summe der Aktivitätswerte, die mit den Substraten im Einzelversuch erhalten werden, auch wenn das Ferment nicht mit Substrat gesättigt ist. Die Aktivitätswerte sind entweder gleich oder kleiner als bei Messung mit DOPA allein (Abb. 2–4).

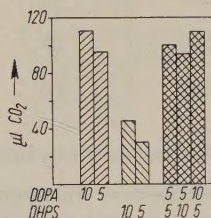


Abb. 2.

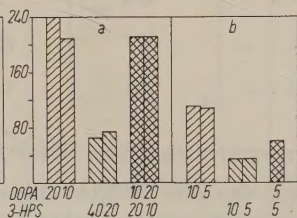


Abb. 3.

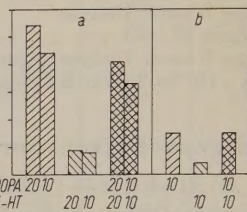


Abb. 4.

Abb. 2–4. CO_2 -Werte von DOPA, DHPS, 3-HPS und 5-HT in getrennten und kombinierten Decarboxylierungsansätzen.

Abb. 2. 3,0 ml Fermentlösung (teilweise gereinigt, QCO_2 DOPA = 222), 1,1 ml Teorell-Stenhagen-Puffer, p_{H} 7,6, und Wasser ad 4,9 ml. Reaktionszeit 60 Min. Substrat: DOPA und DHPS nach Angabe in μMol .

Abb. 3a. 3,0 ml Rohextrakt; Substrat: DOPA und 3-HPS nach Angabe in μMol ; sonst wie Abb. 2.

Abb. 3b wie Abb. 3a, nur halbe Menge Fermentlösung.

Abb. 4a. 1,0 ml Rohextrakt, 1,5 ml 0,1M Phosphatpuffer, p_{H} 6,8, 200 γ Pyridoxal-phosphat und Wasser ad 4,9 ml. Reaktionszeit 10 Min. Substrat: DOPA und 5-HT nach Angabe in μMol .

Abb. 4b wie unter Abb. 4a, nur ohne Pyridoxalphosphat.

c) Abhängigkeit des Substratumsatzes von der Reaktionszeit: Bei Einsatz von DOPA ist die CO_2 -Entwicklung nur etwa bis zur 10. Minute der Inkubationszeit direkt proportional. Die Reaktion kommt dann allmählich zum Stillstand, auch wenn noch genügend Substrat vorhanden ist. Von 10 μMol L-DOPA werden z. B. 85,6%, von 15 μMol 68,5% abgebaut (Abb. 5). Bei Verwendung von gereinigter DOPA-Decarboxylase (Abb. 6), welche durch Pyridoxalphosphat auf das 10fache aktiviert werden kann, wurden ohne Pyridoxalphosphat-Zusatz von 5 μMol L-DOPA nur 35,8% decarboxyliert. Wurde nach dem Stillstand der Reaktion Pyridoxalphosphat zugegeben, so wurde das noch vorhandene Substrat weiter decarboxyliert (a' in Abb. 6). Bei den Hydroxyphenylserinen nimmt die Decarboxylierungsgeschwindigkeit nur langsam ab; Zusatz von Pyridoxalphosphat aktiviert nur sehr wenig (Abb. 6). Dies gilt auch für die Decarboxylierung von 5-HT⁴.

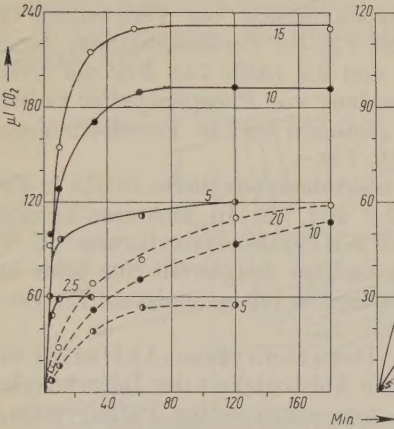


Abb. 5.

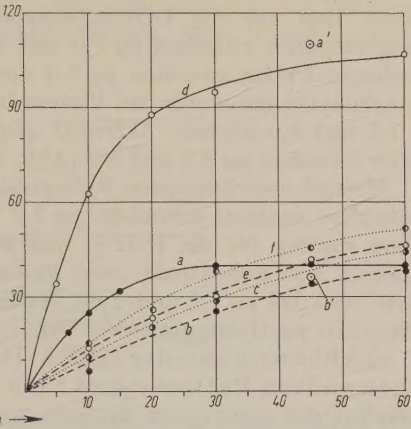


Abb. 6.

Abb. 5 und 6. Decarboxylierung von L-DOPA, DL-erythro-DHPS und DL-erythro-3-HPS in Meerschweinchennierenextrakt in Abhängigkeit von der Zeit und der Substratkonzentration.

Abb. 5. Ansätze: 3,0 ml Rohextrakt; 1,5 ml 0,1m Phosphatpuffer, p_H 7,6; DOPA (—) bzw. 3-HPS (----), wie an den Kurven (in μ Mol) angegeben; Wasser ad 4,9 ml.

Abb. 6. a und d: 5 μ Mol L-DOPA ohne (a) und mit (d) 200 γ Pyridoxalphosphat; b und e: 10 μ Mol DL-DHPS ohne (b) und mit (e) 200 γ Pyridoxalphosphat; c und f: 10 μ Mol DL-3-HPS ohne (c) und mit (f) 200 γ Pyridoxalphosphat.

Die Ansätze enthielten außerdem 0,5 ml (a, b, c, e, f) bzw. 0,1 ml (d) gereinigte Fermentlösung ($Q_{CO_2, DOPA} = 800$; 0,78 mg N/ml), 1,5m Phosphatpuffer vom p_H 6,8 (a, d) bzw. 7,6 (b, c, e, f) und Wasser ad 4,9 ml.

In den Versuchen a' und b' (Schwefelsäure im Zentralgefäß) wurde zu den Ansätzen a bzw. b nach 30 Min. Reaktionszeit 200 γ Pyridoxalphosphat zugekippt.

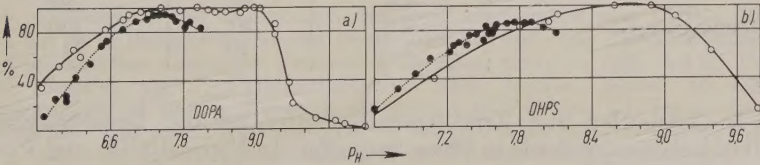


Abb. 7. p_H -Abhängigkeit der DOPA- und DHPS-Decarboxylierung bei gereinigter Meerschweinchennieren-Decarboxylase.

Ordinate: μ l CO_2 in % des bei den Versuchen mit Teorell-Stenhagen-Puffer gefundenen Höchstwertes (a: 84 μ l $CO_2 = 100\%$; b: 58 μ l $CO_2 = 100\%$). Ansätze: 0,15 ml (a) bzw. 1,0 ml (b) Fermentlösung ($Q_{CO_2, DOPA} = 440$; 1,24 mg N/ml), 3,0 ml 0,1m Phosphatpuffer (·····) bzw. 3,0 ml Teorell-Stenhagen-Puffer (—), 1,97 mg DL-DOPA (a) bzw. 2,13 mg DL-DHPS (b), 200 γ Pyridoxalphosphat und Wasser ad 4,9 ml. Reaktionszeit 10 Min. (a) bzw. 30 Min. (b).

d) p_H -Optimum: Das Aktivitätsoptimum des gereinigten Fermentes liegt für die DOPA-Decarboxylierung bei Verwendung von Phosphatpuffer zwischen p_H 7,0 und 7,8, bei Verwendung von Teorell-Stenhagen-Puffer zwischen p_H 7,0 und 9,2 (Abb. 7a). Für die DHPS-Decarboxylierung wurde bei Verwendung von Phosphatpuffer zwischen p_H 7,6 und 8,0 höchste Aktivität gemessen und in Teorell-Stenhagen-Puffer zwischen p_H 8,3 und 8,9 (Abb. 7b).

Meerschweinchenrieren-Rohextrakt decarboxylierte DOPA in Phosphatpuffer optimal zwischen p_H 7,0 und 7,2. In mehreren Versuchsreihen wurden für die DHPS- und 3-HPS-Decarboxylierung bei Verwendung von Rohextrakt zwei p_H -Optima festgestellt (für beide Substrate etwa bei p_H 7,2 und 7,6). Messungen mit gereinigtem Enzym ergaben ein p_H -Optimum (Abb. 7b).

e) Abhängigkeit der DOPA-Decarboxylase-Aktivität vom angewandten Puffersystem: Die Abhängigkeit der Decarboxylase-Aktivität des gereinigten Enzyms vom angewandten Puffersystem ist in Tab. 3 wiedergegeben.

Tab. 3. DOPA-Decarboxylase-Aktivität in verschiedenen Puffersystemen.

Ansätze: 0,2 ml gereinigte Fermentlösung b ($Q_{CO_2, DOPA} = 720$), 1,5 ml Puffer nach Angabe, 0,1m Phosphatpuffer nach Angabe, p_H 7,7, 200 γ Pyridoxalphosphat und 0,985 mg L-DOPA; Reaktionszeit 10 Min.

Puffer ¹⁰	ml 0,1m Phosphatpuffer	μl CO ₂	% der Akt. in Phosphatpuffer
0,1m Na ₂ HPO ₄ /KH ₂ PO ₄ . .	0	62	100
	1,5	65	
Pyrophosphat/HCl	0	41	65
	1,5	51	80
Borax/Borsäure	0	38	60
	1,5	38	60
Veronal/HCl	0	37	60
	1,5	50	80
Tris/HCl	0	58	92
	1,5	60	96
Triäthanolamin/HCl	0	61	100
	1,5	70	111

In Trispuffer und Triäthanolaminpuffer ist die Decarboxylase-aktivität ebenso groß wie in Phosphatpuffer. In Veronal/HCl- und Pyrophosphat/HCl-Puffer erhöht sich die Decarboxylierungsaktivität bei Zugabe von Phosphationen von 60% auf 80% der in Phosphatpuffer allein gemessenen Aktivität. Die Messungen in Borax/Borsäure-Puffer ergaben mit und ohne Phosphatzusatz nur 60% der Werte in Phosphatpuffer. Beim Mischen der Reaktionsansätze fiel auf, daß die gelbe Farbe des

¹⁰ Die Pufferlösungen wurden bereitet nach J. Stauff in H. M. Rauen, Biochem. Taschenbuch S. 650, Springer-Verlag, Heidelberg 1956.

Pyridoxalphosphats durch Boratzugabe aufgehellt wird. Die Spektrophotometrie von Pyridoxalphosphat-Borat-Mischungen ließ erkennen, daß die Konfiguration des Pyridoxalphosphats durch Borat verändert wird (Abb. 8).

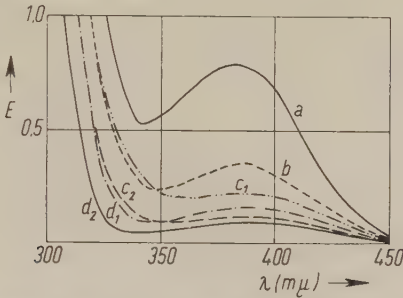


Abb. 8. Absorptionsspektrum von Pyridoxalphosphat in Boratpuffer, p_H 7,7.
Das molare Mischungsverhältnis Borax/Pyridoxalphosphat: a) 100:1 (663 γ Pyridoxalphosphat/ml); b) 200:1 (331 γ Pyridoxalphosphat/ml); c_1) 400:1 (663 γ Pyridoxalphosphat/ml); c_2) 400:1 (166 γ Pyridoxalphosphat/ml); d_1) 800:1 (331 γ Pyridoxalphosphat/ml); d_2) 800:1 (83 γ Pyridoxalphosphat/ml).

Das Absorptionsmaximum des Pyridoxalphosphats bei 385 $m\mu$ wird durch Zugabe von Borationen abgeflacht und verschwindet bei einem Molverhältnis 400:1 fast völlig.

Ohne Pyridoxalphosphat-Zugabe war die Decarboxylase-Aktivität mit DOPA als Substrat in Borat- ebenso hoch wie in Phosphatpuffer. Auch wenn das Ferment vor der Boratzugabe mit dem Coenzym inkubiert wurde, ergaben sich in Phosphat- und Boratpuffer mit DOPA als Substrat gleiche Abbaugeschwindigkeiten. Wurde Pyridoxalphosphat nach dem Boratpuffer zum Ferment gegeben, so blieb dessen Aktivierung aus. Bei Verwendung des borationenhaltigen Teorell-Stenhagen-Puffers ergibt sich bei einer Zugabe von 200 γ Pyridoxalphosphat pro Versuchs-

Tab. 4. Vergleich der Decarboxylierungsgeschwindigkeiten von DOPA, DHPS und 3-HPS in Phosphatpuffer und Boratpuffer mit und ohne Pyridoxalphosphat. Versuchsansätze: Gereinigte Fermentlösung ($Q_{CO_2, DOPA}$ = 680), 1,5 ml Puffer nach Angabe, p_H 7,7, Pyridoxalphosphat nach Angabe, Wasser ad 4,9 ml; Reaktionszeit 30 Min. — Substrat: 0,985 mg L-DOPA bzw. 2,13 mg DL-erythro-DHPS bzw. 1,97 mg DL-erythro-3-HPS. — Bei DOPA als Substrat wurden 0,4 ml, bei den Hydroxyphenylserinen 0,8 ml Fermentlösung verwendet.

Puffer	Pyridoxalph.	$\mu l CO_2$		
	γ	DOPA	DHPS	3-HPS
Phosphat	200	77; 81	33	23; 17
	—	38	30; 30	28; 28
Borax/Borsäure . . .	200	38; 38	5	33; 35
	—	40	2	32

ansatz ein Mol.-Verhältnis Borat : Pyridoxalphosphat von 21:1, bei dem nur ein geringer Bruchteil des eingesetzten Pyridoxalphosphats blockiert wird.

f) Michaelis-Konstante der Coferment-Apoferment-Verbindung: Apodecarboxylase wurde mit verschiedenen Mengen Pyridoxalphosphat vorinkubiert; dann wurde die Decarboxylierungsaktivität gegenüber L-DOPA gemessen. Die Auswertung nach Lineweaver und Burk ergab einen Wert von $9 \times 10^{-8} m$ (Abb. 9).

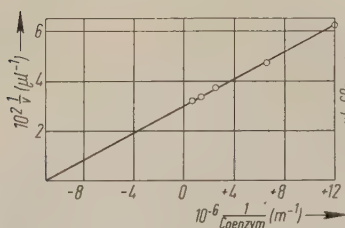


Abb. 9.

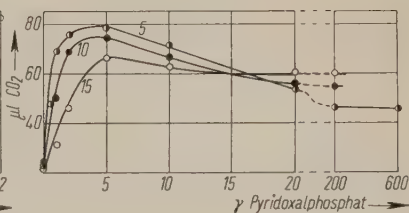


Abb. 10.

Abb. 9. Sättigungskurve der Apodecarboxylase mit Pyridoxalphosphat (Auswertung nach Lineweaver und Burk).

Ansätze: 0,1 ml Fermentlösung (QCO_2 , DOPA = 800), 1,5 ml 0,1m Phosphatpuffer, p_H 6,8, Pyridoxalphosphat wie angegeben; die Ansätze wurden 60 Min. bei $+4^\circ$ vorinkubiert und dann 0,985 mg L-DOPA und Wasser ad 4,9 ml zugesetzt; Reaktionszeit 10 Min.

Abb. 10. Hemmung der DOPA-Decarboxylierung durch Coferment-Überschuß und ihre Abhängigkeit von der Substratkonzentration.

Ansätze: 0,1 ml Enzymlösung (QCO_2 , DOPA = 450), 2,0 ml 0,1m Phosphatpuffer, p_H 6,8, Pyridoxalphosphat wie angegeben und Wasser ad 4,9 ml. Reaktionszeit 10 Min. — Die Zahlen an den Kurven geben die pro Ansatz eingesetzte Menge L-DOPA in μ Mol an.

g) Hemmung der DOPA-Decarboxylase durch Coferment-überschuß: Wird ein DOPA-Decarboxylase-Präparat durch Pyridoxalphosphat aktiviert, so ist bei gleicher Cofermentmenge der Grad der Aktivierung abhängig von der gewählten Substratkonzentration.

Aus Abb. 10 ist ersichtlich, daß die durch überoptimale Pyridoxalphosphat-Konzentration bewirkte Hemmung der Decarboxylierung mit sinkender Substratkonzentration zunimmt.

h) Einfluß von Pyridoxalphosphat-DOPAamin-Verbindung auf die DOPA-Decarboxylierung: Schott und Clark¹¹ wiesen an Hand spektrophotometrischer und enzymatischer Untersuchungen eine „Inaktivierung“ des Pyridoxalphosphats durch DOPA, DOPAamin sowie durch eine Reihe von Phenylalaninderivaten nach. Sie führen das Absinken des prozentualen Umsatzes von DOPA bei der

¹¹ H. F. Schott u. W. G. Clark, J. biol. Chemistry **196**, 449 [1952].

Decarboxylierung mit steigender Reaktionszeit und Substratkonzentration auf eine Blockierung des Coenzym zurück. Wir haben unter Verwendung von gereinigter DOPA-Decarboxylase die Hemmung der DOPA-Decarboxylierung durch DOPAamin und durch DOPAamin-Pyridoxalphosphat-Verbindung in Abhängigkeit von der Coenzym-Konzentration untersucht.

Tab. 5. Hemmung der DOPA-Decarboxylierung durch DOPAamin und Pyridoxalphosphat-DOPAamin-Verbindung in Abhängigkeit von der Coenzym-Konzentration. Ansätze: 0,2 ml Fermentlösung ($Q_{CO_2, DOPA} = 640$), 1,5 ml 0,1*M* Phosphatpuffer, p_H 6,8, Pyridoxalphosphat laut Tabelle. 1 Stde. wurde bei +4° vorinkubiert, dann mit Wasser auf 4,3 ml ergänzt. Im Kipper: Substrat (0,985 mg L-DOPA) bzw. Substrat und Pyridoxalphosphat-DOPAamin-Verbindung bzw. Substrat und DOPAamin (Hemmstoff-Endkonzentration im Reaktionsansatz $1,56 \times 10^{-4} m$), gelöst in 0,6 ml Wasser; Reaktionszeit 10 Min. Der jeweils verwendete Hemmstoff wurde auch den Leeransätzen zugesetzt.

Pyridoxal- phosphat	ohne Zusatz	$\mu l CO_2/10 \text{ Min.}$			
		+ DOPAamin		+ Pyridoxalph.-DOPA- amin	
		% Hemmung		% Hemmung	
0	33	27	18	14	57,5
5	71	58	18	35	51
10	72	55	23,5	38	47,5
20	70	57	18,5	38	46
50	66	52	21	38	42
100	65	49	24,5	48	27
200	62	48	22,5	50	19,5
600	35	47	A*	30	14
800	30	44	A*	30	0

* A = Aktivierung

Die Versuchsdaten lassen erkennen, daß Pyridoxalphosphat-DOPAamin-Verbindung bei hohen Coenzym-Konzentrationen die DOPA-Decarboxylierung nicht beeinflußt, bei niedrigen Pyridoxalphosphat-Konzentrationen aber stark hemmt. Auch DOPAamin hemmt, jedoch bleibt hier die Hemmung unabhängig von der Pyridoxalphosphat-Konzentration etwa gleich groß. Bei höheren Pyridoxalphosphat-Konzentrationen (5×10^{-4} und $6,6 \times 10^{-4} m$) beobachtet man eine scheinbare Aktivierung durch DOPAamin.

i) Hemmung der DOPA-Decarboxylierung durch D-DOPA: Um den Einfluß des biologisch inaktiven optischen Antipoden zu untersuchen, wurde DL-DOPA und L-DOPA in Ansätzen mit und ohne Pyridoxalphosphat inkubiert (Abb. 11).

Eine Hemmung der L-DOPA-Decarboxylierung durch äquimolekulare Mengen D-DOPA, welche in den Versuchsansätzen ohne Coenzym etwa 50% beträgt, wird durch Pyridoxalphosphat-Zusatz wesentlich abgeschwächt.

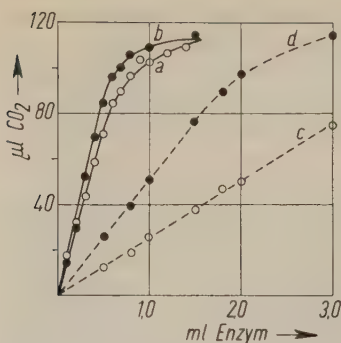


Abb. 11. Abhängigkeit der DOPA-Decarboxylierung von der Enzymkonzentration. — Vergleich des Kurvenverlaufs mit L-DOPA und DL-DOPA mit und ohne Pyridoxalphosphat.

Ansätze: Meerschweinchennieren-Extrakt nach Angabe, 1,5 ml 0,1m Phosphatpuffer, p_H 6,8, Wasser ad 4,9 ml. Reaktionszeit 15 Min. In den Versuchen a und b zusätzlich 200 γ Pyridoxalphosphat. Substrat: a und c: 2,95 mg DL-DOPA, b und d: 1,43 mg L-DOPA.

Besprechung der Ergebnisse

Die Tatsache, daß bei verschiedenen Organen der gleichen Tierart und bei den gleichen Organen verschiedener Tierarten das Verhältnis der Decarboxylierung von DOPA zu der von DHPS großen Schwankungen unterliegt, fand zwei Deutungen: 1. Es gibt zwei verschiedene Decarboxylasen für DOPA und DHPS. 2. Es gibt art- und organspezifische Unterschiede im Apoenzym, die Verschiebungen des Aktivitätsverhältnisses gegenüber DOPA und DHPS verursachen.

Die von anderen Autoren beobachteten Schwankungen haben auch wir festgestellt; darüber hinaus ergab sich, daß die Aktivitäten ein und derselben Enzymlösung gegenüber DOPA und DHPS von der Konzentration an Pyridoxalphosphat abhängig sind. So wird die Decarboxylierung von Hydroxyphenylserinen in den von uns verwendeten Meerschweinchennieren-Rohextrakten durch Pyridoxalphosphat gehemmt, die Decarboxylierung von DOPA dagegen aktiviert. Diese Befunde ließen noch eine dritte Möglichkeit zu, nämlich daß Begleitstoffe in den Organhomogenaten die Decarboxylierung von DOPA und DHPS durch das gleiche Ferment in wechselndem Maße beeinflussen. Die Gesamtheit unserer Befunde spricht für die dritte Möglichkeit. Da die Untersuchungen nur mit Fermentmaterial aus Meerschweinchennieren durchgeführt wurden, lassen sie eine Entscheidung über die zweite Alternative nicht zu.

Die Aktivität des Fermentes ist bei Aktivierung durch 200 γ Pyridoxalphosphat gegenüber L-DOPA auf allen Reinheitsstufen des Fermentes etwa 30mal so hoch wie gegenüber DHPS. In Konkurrenzversuchen ergab sich niemals eine Addition der Aktivitäten von DOPA und DHPS. Die p_H -Optima für beide Substrate sind verschieden. Eine starke Abhängigkeit vom Reinheitsgrad der Enzymlösung ergab sich für die Lage der p_H -Optima von DOPA und den Hydroxyphenylserinen. Sie werden für beide Substrate durch die Entfernung der Begleitsubstanzen um eine ganze p_H -Einheit nach der alkalischen Seite hin verbreitert, außerdem verschwindet der für DHPS bei etwa p_H 7 zu beobachtende deutliche Aktivitätsabfall, welcher bei Messungen mit Rohextrakt zwei p_H -Optima verursacht.

Da Brenzcatechinderivate mit Borationen Komplexe bilden¹², war zu erwarten, daß die DHPS-, nicht aber die 3-HPS-Decarboxylierung bei Messungen in Boratpuffer gehemmt wird. Dies war in der Tat der Fall. Die DOPA-Decarboxylierung aber wurde auch bei großem Überschuß an Borationen nicht gehemmt, was dafür spricht, daß die Affinität von DOPA zum Enzym größer ist als die zum Borat. Wird Pyridoxalphosphat mit Borat in großem Überschuß (Molverhältnis 1:400) vorinkubiert, so vermag es die DOPA-Apodecarboxylase nicht mehr zu aktivieren.

Bei der Reinigung des Enzyms wird das Coenzym mehr oder weniger weitgehend abgetrennt. Es wird daher die Decarboxylierungsaktivität von DOPA und den Hydroxyphenylserinen durch Pyridoxalphosphat-Zusatz stets aktiviert, wogegen bei Anwendung von Rohextrakt durch Pyridoxalphosphat-Zusatz meist eine Hemmung der Hydroxyphenylserin-Decarboxylierung und gelegentlich auch der DOPA-Decarboxylierung beobachtet wird. Der Grad der Aktivierung ist von der Pyridoxalphosphat-Konzentration abhängig; so sinkt die Decarboxylierungsaktivität nach Erreichen eines Höchstwertes bei optimaler Pyridoxalphosphat-Konzentration durch größere Mengen Coenzym wieder ab. Die Aktivitätsabnahme durch überoptimale Pyridoxalphosphat-Konzentration ist für DOPA stärker als für DHPS, wie ja auch die Aktivierung bei Anwendung von DOPA als Substrat stets deutlicher hervortritt als bei DHPS. Das völlig vom Coferment befreite Ferment vermag weder DOPA noch die Hydroxyphenylserine zu decarboxylieren.

Das zugesetzte Pyridoxalphosphat wird nicht allein durch Holofermentbildung verbraucht, sondern auch durch Reaktion mit dem Substrat, ferner mit den durch die Decarboxylierung entstandenen Aminen und noch mit weiteren im Reaktionsgemisch vorhandenen Substanzen¹³. Schott und Clark¹¹, sowie Holtz und Westermann¹⁴ bestimmten anhand von enzymatischen und spektrophotometrischen Messungen die Geschwindigkeit der Entstehung von Pyridoxalphosphat-Verbindungen mit verschiedenen Aminen und Aminosäuren. Die Ergebnisse der beiden Arbeitskreise stimmen nicht ganz überein. Ordnet man nach Holtz und Westermann die Bildungsgeschwindigkeiten von Pyridoxalphosphat-Verbindungen mit den uns hier interessierenden Substanzen, so ergibt sich folgende Reihe: DHPS > DOPA > Noradrenalin > Hydroxytyramin > 3-HPS > β -Hydroxy- β -[3-hydroxy-phenyl]-äthylamin (Novadral) > Adrenalin. Möglicherweise sind die erwähnten Unterschiede in den Meßergebnissen der verschiedenen Arbeitskreise durch den wechselnden Einfluß von Metallverunreinigungen bedingt, da die stark gelb gefärbten Pyridoxalphosphat-Verbindungen nach Metallionenzusatz rasch ausbleichen.

¹² E. Werle u. F. Roewer, *Biochem. Z.* **322**, 320 [1952]; H. F. Zipf, *Naunyn-Schmiedebergs Arch. exp. Pathol. Pharmacol.* **207**, 540 [1949].

¹³ H. N. Christensen, *J. Amer. chem. Soc.* **80**, 99 [1958]; Y. Matsuo, *J. Amer. chem. Soc.* **79**, 2011 [1957].

¹⁴ P. Holtz u. E. Westermann, *Naunyn-Schmiedebergs Arch. exp. Pathol. Pharmacol.* **231**, 311 [1957].

Daß an Pyridoxalphosphat gebundenes DOPA nicht decarboxyliert wird, geht aus den Untersuchungen von Pellerin und D'Ioro¹⁵ hervor, welche Stoffwechselprodukte von DOPA-¹⁴C nach Inkubation mit Rindernebennierenmark bei 37° (Phosphatpuffer, p_H 7,4, 0,005*m* DOPA) papierchromatographisch identifizierten und quantitativ bestimmten. Nach 2stdg. Inkubation wurden 10—15% des eingesetzten DOPA als DOPAamin und 1% als Schiffsche Base aus DOPA und Pyridoxalphosphat wieder gefunden; wurde dem Reaktionsansatz Pyridoxalphosphat zugesetzt, so wurden 41% des Substrates als Pyridoxalphosphat-Verbindung wiedergefunden. Holtz und Westermann nehmen eine irreversible Umwandlung der Schiffschen Basen aus Pyridoxalphosphat und den Substraten der DOPA-Decarboxylase an zu Verbindungen vom Typus des Tetrahydroisochinolins bzw. bei Brenzcatechinderivaten zu Aminoalkylo-Chinon-Derivaten, deren Aminogruppe mit dem C-Atom 3 des Pyridoxalphosphats verknüpft ist.

In Übereinstimmung mit den Versuchen von Holtz und Westermann wird die DOPA-Decarboxylase durch Inkubate von Pyridoxalphosphat mit DOPA und anderen Brenzcatechinamin-Derivaten gehemmt. Die Hemmwirkung der Pyridoxalphosphat-Verbindungen ist von der Coenzym-Konzentration abhängig, wie dies am Beispiel von Pyridoxalphosphat-DOPAamin gezeigt werden konnte (Tab. 5). Die Decarboxylierung wird also durch Verarmung an Holoferment, durch irreversible Bindung des Substrates an Pyridoxalphosphat sowie durch Konkurrenz der Coenzym-Substrat- und Coenzym-Reaktionsprodukt-Verbindungen mit freiem Pyridoxalphosphat um das Apoferment gestoppt.

Die Aktivierung der Apodecarboxylase durch Pyridoxalphosphat wird also durch eine Hemmung durch Pyridoxalphosphat-Verbindungen überlagert. Die Größe der Hemmung hängt dann von der Bildungsgeschwindigkeit der jeweiligen Pyridoxalphosphat-Verbindung und der Affinität dieser Verbindungen zum Enzym ab, die bei den verschiedenen Substraten und deren Decarboxylierungsprodukten sehr verschieden ist.

So wird das Absinken der Decarboxylierungsaktivität bei überoptimaler Pyridoxalphosphat-Konzentration (Abb. 10) verständlich, besonders bei niedriger Substratkonzentration, da hier der Substratverbrauch durch die Nebenreaktionen relativ groß ist. Bei optimaler Pyridoxalphosphat-Konzentration ist die DOPA-Decarboxylierungsgeschwindigkeit in Gegenwart höherer Substratkonzentration geringer als bei niedriger Substratkonzentration, wahrscheinlich infolge Substrathemmung. Die Hemmung durch Coenzym-Überschuß wird so kompensiert, daß sie bei der höheren Substratkonzentration nicht so deutlich hervortritt wie bei der niedrigen.

Die Decarboxylierung von L-DOPA wird beim Rohenzym durch äquimolekulare Mengen von D-DOPA zu etwa 50% gehemmt. Der Effekt ist wohl durch eine kompetitive Hemmung des Fermentes durch D-DOPA

¹⁵ J. Pellerin u. A. D'Ioro, Canad. J. Biochem. Physiol. **35**, 151 [1957].

bedingt. Die Hemmung ist nach Zusatz von Pyridoxalphosphat vermindert. Wie L- so bildet auch D-DOPA einen Komplex mit Pyridoxalphosphat. Nach Zugabe von DL-DOPA zum Enzym verteilt sich offenbar der DOPA-Verbrauch durch Komplexbildung mit Pyridoxalphosphat auf beide Antipoden, so daß mehr Substrat für die Decarboxylierungsreaktion übrig bleibt. Es resultiert so eine geringere Hemmung als zu erwarten wäre.

Es ist anzunehmen, daß auch die D-Form der Hydroxyphenylserine die Decarboxylierung der L-Hydroxyphenylserine beeinflusst. Leider standen uns diese Substanzen nur als Racemate zur Verfügung.

Nach Clark, Weissbach und Udenfriend⁴ ist die 5-Hydroxytryptophan-Decarboxylase der Meerschweincheniere verschieden von der DOPA-Decarboxylase. Die Autoren beobachteten eine Änderung des Aktivitätsverhältnisses gegenüber DOPA und 5-HT im Verlauf der Anreicherung der 5-HT-Decarboxylase. Diese Bestimmungen wurden anscheinend ohne Aktivierung durch Pyridoxalphosphat ausgeführt. In unseren Versuchen blieb dagegen das Decarboxylierungs-Verhältnis für DOPA und 5-HT im Verlauf der Anreicherung der DOPA-Decarboxylase unverändert. Die Histidindecarboxylase dagegen wurde völlig abgetrennt. Unsere Konkurrenzversuche mit 5-HT und DOPA ergeben wie die Konkurrenzversuche mit DOPA, DHPS oder 3-HPS die gleichen oder niedrigere Aktivitätswerte wie für DOPA allein. Unsere Versuchsergebnisse sprechen also dafür, daß DOPA, die Hydroxyphenylserine und 5-HT durch ein und dasselbe Ferment decarboxyliert werden. Es ist allerdings nicht ausgeschlossen, daß für die Decarboxylierung von DOPA und 5-HT zwei verschiedene Fermente vorliegen, deren Aktivität durch die beiderseitigen Substrate konkurrierend gehemmt wird.

Zusammenfassung

1. Durch Hitzedenaturierung, Kieselguradsorption und Ammoniumsulfatfraktionierung wurde aus Meerschweinchenieren eine etwa 25fach angereicherte, sehr stabile DOPA-Decarboxylase gewonnen. Durch Chromatographie an Aluminiumoxyd konnte diese bis 82fach angereichert werden, wobei jedoch die Stabilität verloren ging.

Im Verlauf der Reinigung wurde die Histidin-Decarboxylase von der DOPA-Decarboxylase vollkommen abgetrennt. Dagegen blieb das Aktivitätsverhältnis der Präparate gegenüber DOPA, 3,4-Dihydroxy-phenylserin und 5-Hydroxy-tryptophan konstant.

2. Eine vollständige Abtrennung des Cofermentes gelang durch Dialyse des gereinigten Enzyms gegen Trilon-B-Lösung. Die Michaelis-Konstante der Apoferment-Coferment-Verbindung wurde zu 9×10^{-8} m bestimmt.

3. Der Grad der Aktivierung des Fermentes durch Pyridoxalphosphat hängt von Art und Konzentration des Substrates und von Begleit-substanzen ab, da das Coenzym mit den Substraten und ihren Decarb-

oxylierungsprodukten Verbindungen bildet, welche die Decarboxylierung hemmen. Das verschiedenartige Verhalten der Enzymaktivität gegenüber DOPA und Hydroxyphenylserinen konnte größtenteils auf das Ineinandergreifen folgender Reaktionen zurückgeführt werden: Apoferment + Pyridoxalphosphat $\rightleftharpoons$ Holoferment; Holoferment + Substrat $\rightarrow$ Amin + CO₂; Substrat + Pyridoxalphosphat $\rightarrow$ Hemmstoff; Amin + Pyridoxalphosphat $\rightarrow$ Hemmstoff.

Summary

1. A 25 fold purification of the very stable DOPA decarboxylase from guinea pig kidney was achieved by heat denaturation, adsorption onto silica gel and fractionation with ammonium sulphate. By chromatography on aluminium oxide, the enzyme was further purified up to 82 fold, but with a loss of stability.

In the course of purification, the histidine decarboxylase was totally separated from the DOPA decarboxylase. However, the ratio of the activities of the preparations to DOPA, 3,4-dihydroxy-phenylserine and 5-hydroxytryptophan remained constant.

2. A complete separation of the coenzyme was possible by dialysis of the purified enzyme against a solution of Trilon B. The Michaelis constant of the apoenzyme-coenzyme complex was determined as 9×10^{-8} M.

3. The activation of the enzyme by pyridoxal phosphate is dependent on the nature and concentration of the substrate and accompanying substances, because the coenzyme forms compounds with the substrates and their decarboxylation products, which inhibit the decarboxylation. The different enzyme activities towards DOPA and hydroxy-phenylserine was shown to be due largely to the interaction of the following reactions: apoenzyme + pyridoxal phosphate $\rightleftharpoons$ holoenzyme; holoenzyme + substrate $\rightarrow$ amine + CO₂; substrate + pyridoxal phosphate $\rightarrow$ inhibitor; amine + pyridoxal phosphate $\rightarrow$ inhibitor.

Prof. Dr. Dr. E. Werle, Klin. Chem. Abteilung der Chirurgischen Klinik der Universität München, Nußbaumstr. 20.

Lebenslauf

Am 8. Januar 1925 wurde ich als Tochter des Architekten Karl Aures und seiner Ehefrau Barbara geb. Huber in Kaiserslautern geboren. Nach vierjähriger Grundschulzeit besuchte ich die Oberschule in Kaiserslautern, wo ich im März 1943 die Reifeprüfung ablegte. Vom März 1943 bis Mai 1945 war ich zum Arbeitsdienst und Wehrdienst einberufen.

1946 begann ich mit dem Studium der Naturwissenschaften und der Chemie an der Ludwig-Maximilians-Universität in München, wo ich mich im März 1951 der Diplomchemiker-Vorprüfung und im Juli 1953 der Diplomchemiker-Hauptprüfung unterzog. Meine Diplomarbeit mit dem Thema: „Zur Kenntnis der α -Formen von 1-Azido-aceto-d-glucosen“ führte ich von September 1953 bis Juni 1954 unter der Leitung von Herrn Prof. Dr. A. Bertho im organisch-chemischen Institut der Universität München durch.

Seit November 1954 arbeite ich im wissenschaftlichen Laboratorium der Chirurgischen Universitätsklinik in München bei Herrn Prof. Dr. Dr. E. Werle. Mit der vorliegenden Dissertation begann ich im September 1955.

